



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication : **0 546 916 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **92403309.5**

(51) Int. Cl.⁵ : **G01N 33/92, G01N 27/26**

(22) Date de dépôt : **07.12.92**

(30) Priorité : **11.12.91 FR 9115387**

(43) Date de publication de la demande :
16.06.93 Bulletin 93/24

(84) Etats contractants désignés :
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

(71) Demandeur : **SEBIA**
23 rue Maximilien Robespierre
F-92130 Issy-Les-Moulineaux (FR)

(72) Inventeur : **Bellon, Franck**
12 Chemin des Ajoncs
F-91160 Longjumeau (FR)
Inventeur : **Bringard, Aline**
19 rue Marie Roche
F-91090 Lisses (FR)

(74) Mandataire : **Desaix, Anne et al**
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 67
bld. Haussmann
F-75008 Paris (FR)

(54) Procédé de séparation de la Lp(a) par électrophorèse, gels pour la mise en oeuvre de ce procédé, et application à la détermination in vitro du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a).

(57) L'invention concerne un procédé de séparation par électrophorèse de la Lp(a) et des différentes lipoprotéines contenues dans un milieu biologique.

La présente invention se caractérise en ce que la migration électrophorétique des lipoprotéines est réalisée dans des conditions telles que le gel d'électrophorèse et/ou le milieu biologique susmentionné contient des composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines.

EP 0 546 916 A1

La présente invention a pour objet un procédé de séparation de la Lp(a) par électrophorèse, des gels pour la mise en oeuvre de ce procédé, ainsi que l'application de ce procédé à la détermination du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a) et plus particulièrement des risques que présente un individu d'être atteint d'une maladie telle que l'athérosclérose ou toute autre pathologie liée à cette dernière.

5 L'électrophorèse du sérum ou du plasma humain en gel d'agarose, suivie d'une coloration spécifique des lipides, permet de séparer et de visualiser les différentes fractions lipoprotéiques, HDL, VLDL, LDL et chylomicrons, dont les taux respectifs sont de précieux indicateurs des risques d'athérosclérose (FREDRICKSON et al., 1967, New Engl. J. Med., 276).

La "Lp(a)" est une lipoprotéine particulière, identifiée par BERG en 1963 (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 59, 369). Elle présente une grande similitude structurale avec les LDL, mais est caractérisée par une partie protéique supplémentaire, appelée apo(a), liée à l'apo B100 par des ponts disulfures.

Bien que le rôle physiologique de la Lp(a) ne soit pas encore parfaitement élucidé, de nombreuses études cliniques ont montré qu'un taux élevé de Lp(a) plasmatique (supérieur à 0,3 g/l) constitue un facteur indépendant de risque athérogène (KOSTNER et al., 1981, Atherosclerosis, 38, 51; RHOADS et al. 1986, J. Ann. Med. Assoc., 256, 2540).

Actuellement, l'électrophorèse classique du sérum ou du plasma humain (gel standard : agarose 0,5 %, en tampon Tris Véronal; voir Figure 1A), permet généralement la résolution de trois fractions lipoprotéiques: les HDL (position α), les VLDL (position pré β) et les LDL (position β). La fraction Lp(a), quand elle est présente, migre en position pré β 1, et ne peut généralement pas être distinguée des VLDL de manière suffisante pour conclure de façon certaine sur sa présence ou son absence dans le cadre de la détermination du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a) (BRUCKERT et al., 1990, Clin. Chim. Acta, 188, 71).

Par conséquent, les différentes méthodes permettant de dépister ou de doser la Lp(a) plasmatique reposent toutes, à l'heure actuelle, sur l'utilisation d'anticorps spécifiques. Ces méthodes sont plus particulièrement les suivantes: l'immunonéphélométrie (CAZZOLATO et al., 1983, Clin. Chim. Acta, 135, 203), l'électrosynérèse (MOLINARI et al., 1983, Clin. Chim. Acta, 128, 373), l'électroimmunodiffusion selon LAURELL (KOSTNER et al., 1981, Atherosclerosis, 38, 51), les techniques immunocytométriques ELISA (ABE et al., 1988, Clin. Chim. Acta, 177, 31), ainsi qu'une technique d'immunolatex (VU DAC et al., 1985, J. Lipid. Res., 26, 267).

Cependant, ces dosages sont généralement coûteux, et ne sont pas prescrits systématiquement par le clinicien dans le cadre d'une recherche de dyslipoprotéinémie. Préalablement à un tel dosage, il serait donc très intéressant de pouvoir dépister la présence de Lp(a) en quantité pathologique lors d'une analyse lipoprotéique courante.

Un des buts de la présente invention est précisément de mettre à la disposition des cliniciens, un procédé de séparation de la Lp(a) des autres lipoprotéines du sérum, qui soit d'un prix de revient nettement inférieur aux procédés actuels, et qui, par conséquent, puisse être prescrit dans le cadre d'une recherche de dyslipoprotéinémie courante.

La présente invention a également pour but de permettre le dépistage de façon fiable de la Lp(a), et par conséquent le diagnostic *in vitro* fiable du risque d'apparition chez un individu de pathologies liées à l'athérosclérose.

L'invention concerne un procédé de séparation par électrophorèse de la Lp(a) et des différentes lipoprotéines contenues dans un milieu biologique, caractérisé en ce que la migration électrophorétique des lipoprotéines est réalisée dans des conditions telles que le gel d'électrophorèse et/ou le milieu biologique sus-mentionné contient des composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines.

Le procédé sus-mentionné est plus particulièrement caractérisé en ce qu'il permet de séparer systématiquement, dans un milieu biologique, la fraction Lp(a) des fractions VLDL et LDL, de préférence tout en conservant la séparation des HDL, LDL et VLDL.

Un procédé de l'invention particulièrement avantageux est caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport à celle des autres lipoprotéines est choisi parmi les cations ou complexes cationiques, les molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement ou les agents tensio-actifs neutres.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé de l'invention, les composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines, sont incorporés dans le gel d'électrophorèse utilisé. C'est avantageusement le cas des cations.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé de l'invention, les composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines, et plus particulièrement les molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement ou les agents tensio-actifs neutres, sont introduits dans le milieu biologique avant de procéder à

l'électrophorèse sur gel classique.

De préférence, les molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement susceptibles d'être additionnées au milieu biologique, sont plus particulièrement celles caractérisées en ce qu'elles ont des propriétés tensio-actives.

5 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les gels de l'invention peuvent également être préparés à partir de gels classiques modifiés par pénétration des composés chargés, anioniques ou cationiques, préalablement incorporés dans le tampon de migration. Cette incorporation est réalisée soit au cours d'une prémigration électrophorétique précédant le dépôt des échantillons (le dépôt ayant lieu soit dans la zone du gel où ces composés chargés auront pénétré, soit à proximité de cette zone) soit au cours de l'électrophorèse proprement dite.

10 Les composés chargés, anioniques ou cationiques, peuvent indifféremment être incorporés aux tampons anodiques ou cathodiques ou bien pour les composés anioniques uniquement au tampon cathodique et pour les composés cationiques uniquement au tampon anodique.

15 Lorsque le dépôt de l'échantillon (milieu biologique) est effectué dans une zone d'un gel dans lequel les composés cationiques ou anioniques ont pénétré par une étape de préélectrophorèse, le lipidogramme obtenu est identique à celui qui serait obtenu avec un gel dans lequel ces composés cationiques ou anioniques auraient été introduits directement lors du coulage du gel.

20 En revanche, si le dépôt des échantillons est réalisé dans une zone de gel non encore atteinte par ces composés cationiques ou anioniques, étant entendu que les lipoprotéines de l'échantillon seront amenées au contact de ces composés cationiques ou anioniques lors de la migration électrophorétique proprement dite de ces échantillons, le profil obtenu sur le lipidogramme sera la résultante de la séparation obtenue sur un gel classique et de la séparation obtenue sur un gel modifié selon l'invention. Il sera d'autant plus semblable au lipidogramme qui serait obtenu sur un gel où les composés cationiques ou anioniques sont présents, que le dépôt de l'échantillon effectué après l'étape de préélectrophorèse sera réalisé à plus faible distance de la zone du gel où ces composés cationiques ou anioniques auront pénétré par la prémigration.

25 L'addition de ces composés dans le gel ou le milieu biologique modifie de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport à celle des autres lipoprotéines.

30 Les cations ou complexes cationiques ou les agents tensio-actifs neutres présentent la propriété de ralentir la vitesse de migration électrophorétique des lipoprotéines par rapport à la vitesse de migration de ces mêmes lipoprotéines sur un gel d'électrophorèse classique ne contenant pas ces cations ou complexes cationiques ou ces agents tensio-actifs neutres. Cependant, la vitesse de migration de la Lp(a) est moins ralentie que celle des autres lipoprotéines, ou est même non modifiée par rapport à celle obtenue avec un gel ne contenant pas de cations ou de complexes cationiques ou d'agents tensio-actifs neutres.

35 Pour une lipoprotéine donnée, si l'on considère que d/d_0 représente le rapport entre la distance de migration sur le gel contenant le composé et la distance de migration sur le gel témoin de cette même lipoprotéine, et que la fraction Lp(a) est individualisée si sa distance par rapport à la fraction la plus proche (à savoir la VLDL) est d'au moins 3 mm, le facteur de freinage (d/d_0) de la fraction VLDL caractérisant les procédés de l'invention utilisant des cations ou complexes cationiques ou des agents tensio-actifs neutres, est inférieur ou égal à 0,7.

40 Les molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement présentent quant à elles la propriété d'accélérer la vitesse de migration électrophorétique des lipoprotéines par rapport à la vitesse de migration de ces mêmes lipoprotéines sur un gel d'électrophorèse classique ne contenant pas ces molécules chargées négativement. Quant à la Lp(a), sa vitesse de migration n'est sensiblement pas modifiée par la présence d'une molécule sus-mentionnée.

45 A ce titre, toujours dans l'hypothèse où la fraction Lp(a) est individualisée si sa distance par rapport à la fraction la plus proche (à savoir la LDL) est d'au moins 3 mm, le facteur d'accélération (d/d_0) de la fraction LDL caractérisant les procédés de l'invention utilisant des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement, est au moins de l'ordre de 2,3.

50 Comme vu précédemment, la vitesse de migration des lipoprotéines sur le gel est diminuée en présence de cations ou complexes cationiques, la Lp(a) étant moins ralentie que les autres lipoprotéines, elle devient dans ces conditions nettement individualisée sur le gel. Sur le lipidogramme de la Figure 2A, la présence d'une fraction supplémentaire entre les VLDL et les HDL caractérise donc la Lp(a). Cette fraction supplémentaire a été identifiée sans ambiguïté par immunofixation : la bande lipoprotéique en question est révélée par les anticorps spécifiques dirigés contre les apolipoprotéines apoB et apo(a), alors qu'elle ne réagit pas avec les anti-apo-AI, -apo-AII, -apo-CIII et -apo-E (Figure 3).

55 Un procédé particulièrement avantageux dans le cadre de la présente invention est caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport à celle des autres lipoprotéines est choisi parmi les cations ou complexes cationiques dont les hydroxydes, à pH allant d'environ 8 à environ 9, ne sont pas précipités ou sont partiellement précipités, de telle sorte qu'il y

ait au moins 10^{-3} moles/l de cations ou de complexes cationiques non précipités dans le gel pour électrophorèse.

De préférence, les cations utilisés dans le cadre de la présente invention ont un degré d'oxydation supérieur ou égal à 2.

5 De façon avantageuse, les cations sont choisis parmi les colonnes IIa, IIIa et IIIb du tableau de Mandeleiev. Ces cations sont avantageusement choisis parmi Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , In^{3+} et Y^{3+} .

De préférence, le cation utilisé est Mg^{2+} .

10 Les complexes cationiques utilisés dans le cadre de la présente invention, sont avantageusement choisis parmi NH_4^+ , $(NH_4)_2Fe^{2+}$, $NH_4^+Fe^{3+}$.

La concentration des cations ou complexes cationiques dans le gel est avantageusement de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-1} M, et de préférence de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$ à $3 \cdot 10^{-2}$ M. L'effet observé de séparation de la Lp(a) et des autres lipoprotéines s'accroît en augmentant la concentration des cations ou complexes cationiques. Toutefois, l'incorporation d'une trop grande quantité de sel (au-delà de 10^{-1} M, voir même 0,06 M) n'est pas souhaitable, car ceci augmente le temps de migration nécessaire, et nuit à la séparation des fractions VLDL et LDL.

L'anion composant le sel en solution de ces cations ou complexes cationiques n'intervient pas dans l'effet observé de séparation de la Lp(a) et des autres lipoprotéines (chlorure, acétate, sulfate...).

20 Un autre procédé particulièrement préféré de l'invention est caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines est une molécule ayant une partie hydrophobe et chargée négativement.

De préférence, la molécule ayant une partie hydrophobe et chargée négativement,

soit fait partie de la classe des agents tensio-actifs anioniques et comprend

- 25 * soit une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée de 3 à 10 atomes de carbone, comportant éventuellement des hétéroatomes, comportant une fonction acide telle que sulfurique, sulfonique, carboxylique ou phosphorique, et possédant une chaîne aliphatique condensée comportant au moins 1 à 6 cycles saturés de 5 ou 6 atomes de carbone,
- * soit une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée d'au moins 8 atomes de carbone, de préférence de 10 à 18 atomes de carbone, cette chaîne étant le cas échéant substituée par un (ou plusieurs) cycle(s) ou hétérocycle(s) aromatique(s), ladite chaîne ou ce (ou ces) cycle(s) ou hétérocycle(s) aromatique(s) étant substitué(s) par une fonction acide telle que carboxylique, sulfonique ou phosphorique,
- 30 * soit est un dérivé aromatique chargé négativement et comportant au moins deux cycles aromatiques condensés tel que le naphthalène, ou un cycle aromatique condensé à un hétérocycle aromatique telle que la quinoléine, ou deux hétérocycles aromatiques condensés, l'un au moins des cycles comportant une fonction acide telle que sulfurique, carboxylique, sulfonique ou phosphorique etc... et l'autre cycle ne comportant pas de fonction susceptible de faire perdre à l'ensemble de la molécule son caractère hydrophobe et notamment ne comportant pas de charge polaire.

Parmi les agents tensio-actifs anioniques, on peut citer le sodium dodécylsulfate, le sodium dodécylbenzènesulfonate et le cholate de sodium.

40 Des dérivés aromatiques chargés négativement sont avantageusement choisis parmi les composés suivants:

- acide naphthalène carboxylique-2,
- acide naphthalène sulfonique-2,
- acide amino-2 naphthalène sulfonique-1,
- 45 - acide hydroxy-4 naphthalène sulfonique-1,
- acide amino-1 naphthalène sulfonique-5,
- Noir Amido,
- Violet Acide 17,
- Bleu de Coomassie R250,
- 50 - Palatine fast black wan,

et de préférence:

- acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2,
- acide hydroxy-3 naphthalène carboxylique-2.

55 Pour les agents tensio-actifs anioniques, la gamme de concentration efficace est avantageusement dans le gel d'environ 10^{-6} à environ 10^{-3} M, et de préférence d'environ 10^{-4} à environ 10^{-3} M. Dans le cas où les agents tensio-actifs anioniques sont introduits dans le milieu biologique avant électrophorèse, leur concentration est avantageusement d'environ 10^{-4} M à 10^{-1} M, et de préférence d'environ 10^{-3} M à environ 10^{-2} M. Cette concentration est telle que la vitesse de la migration de la LDL est davantage accélérée que celle de la fraction

Lp(a) de sorte que la distance minimale entre la Lp(a) et la fraction LDL, sur le gel, est d'au moins 3 mm (la Lp(a) se situant "derrière" la fraction LDL).

En ce qui concerne les dérivés aromatiques chargés négativement, la gamme de concentration efficace dans le gel est d'environ 10^{-3} M à environ 10^{-1} M, de préférence d'environ 10^{-2} M à environ 5.10^{-2} M, et s'ils sont introduits préalablement dans le milieu biologique leur gamme de concentration efficace est d'environ 10^{-2} M à environ 1 M, de préférence d'environ 5.10^{-2} M à 5.10^{-1} M.

Selon un autre mode de réalisation préférée de l'invention, le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines est un agent tensio-actif neutre (ou détergent neutre).

De préférence l'agent tensio-actif neutre est tel qu'il est soluble en phase aqueuse, et est avantageusement choisi parmi le Triton X100®, Triton X405®, le Tween 20®, le NP40® et le BRIJ35®.

Lorsqu'ils sont dans le gel, les agents tensio-actifs neutres sont avantageusement à une concentration d'environ 10^{-6} à 10^{-3} M, de préférence de 10^{-4} M à 10^{-3} M. Lorsqu'ils sont introduits dans l'échantillon biologique, préalablement à l'électrophorèse, les agents tensio-actifs neutres sont avantageusement à une concentration d'environ 10^{-4} M à 10^{-1} M, et de préférence 10^{-3} M à 10^{-2} M.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séparation de la Lp(a) et des différentes lipoprotéines contenues dans un milieu biologique, est avantageusement réalisée sur un gel d'électrophorèse modifié par rapport à un gel classique, par un mélange de composés cationiques et de détergent neutre. Ces composés susceptibles de modifier la mobilité des Lp(a) sont ajoutés selon les modalités précédemment décrites conformément aux différents modes de réalisation de l'invention.

Les proportions respectives des composés cationiques et des détergents neutres utilisés sont déterminées par les propriétés de ces constituants, à savoir leur capacité à ralentir préférentiellement certaines fractions lipoprotéiques. Un ralentissement suffisant des VLDL permettant de visualiser la Lp(a) peut être obtenu en utilisant exclusivement un composé cationique ou un détergent neutre.

Mais dans le cas de l'utilisation d'un sérum très frais (ayant moins de 24h lorsqu'il est conservé à 4°C) la grande mobilité des VLDL observée oblige à utiliser une concentration très importante de composés cationiques et dans ce cas les LDL trop ralenties restent au point de dépôt et la force ionique atteinte est excessive ce qui entraîne un temps de migration plus long. Dans ce cas on peut avantageusement ajouter un détergent neutre aux composés cationiques.

De même lorsqu'avec un sérum très frais on utilise seulement un détergent neutre, on peut observer un trop fort ralentissement de la fraction LDL qui peut masquer la Lp(a), ainsi qu'une distorsion des bandes. L'utilisation conjuguée, en proportions optimales déterminables par l'homme du métier, de composés cationiques et de détergent neutre permet d'obtenir le profil lipoprotéique souhaité.

L'invention a également pour objet tout gel pour électrophorèse caractérisé en ce qu'il comprend des cations ou complexes cationiques.

Les cations ou complexes cationiques compris dans ces gels sont avantageusement choisis parmi ceux décrits ci-dessus.

L'invention concerne aussi tout gel pour électrophorèse caractérisé en ce qu'il comprend des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement, notamment celles choisies parmi les molécules décrites ci-dessus.

L'invention concerne également tout gel pour électrophorèse caractérisé en ce qu'il comprend des agents tensio-actifs neutres, notamment ceux choisis parmi les agents décrits ci-dessus.

L'invention vise de préférence un gel d'électrophorèse, caractérisée en ce qu'il comprend en mélange, des composés cationiques et des détergents neutres.

L'invention vise plus particulièrement l'utilisation de ces gels pour la mise en oeuvre d'un procédé de séparation par électrophorèse de la Lp(a) et des différentes fractions lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, tel que décrit ci-dessus.

Un gel particulièrement préféré de l'invention est celui comprenant à titre de cation Mg^{2+} , dans les conditions de concentration précisées ci-dessus.

Les gels de l'invention sont, la présence de composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines mise à part, des gels classiquement utilisés dans le domaine de l'électrophorèse, notamment des gels d'agarose, de polyacrylamide ou d'acétate de cellulose.

Les gels de l'invention peuvent être préparés par mélange de la solution des composés sus-mentionnés avec celle du gel à chaud, suivi d'une étape de solidification du gel par retour à température ambiante.

Les gels de l'invention peuvent également être préparés par immersion d'un gel dans une solution de composés sus-mentionnés, pendant un temps suffisant pour que pénétre la quantité requise de composé sus-mentionné.

L'invention concerne également l'application du procédé de séparation de la Lp(a) décrit ci-dessus, à la détermination, chez l'Homme, du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a) dans l'organisme.

A ce titre, l'invention a pour objet une méthode de détermination *in vitro* du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a), cette méthode étant réalisée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez l'homme, notamment à partir de sérum ou de plasma, et comprenant:

- le dépôt d'une quantité appropriée de l'échantillon biologique sous forme liquide sur un gel d'électrophorèse contenant au moins un composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines, notamment un gel tel que défini ci-dessus, ou sur un gel préparé extemporanément, à partir d'un gel classique ne comprenant pas de composé tel que défini ci-dessus, par immersion, pendant un temps suffisant, de ce gel classique dans une solution de ce composé pour que pénétre la quantité requise de composé sus-mentionné, notamment dans une solution contenant des cations ou complexes cationiques choisis notamment parmi ceux cités ci-dessus, ou des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement choisies notamment parmi celles citées ci-dessus ou des agents tensio-actifs neutres choisis notamment parmi ceux cités ci-dessus,
- une étape de migration électrophorétique,
- la détection de la Lp(a) éventuellement présente dans l'échantillon biologique, notamment à l'aide d'un colorant spécifique des lipoprotéines tel que le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides ou d'anticorps dirigés contre les lipoprotéines, et en particulier contre la Lp(a).

L'invention concerne également une méthode de détermination *in vitro* du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a), cette méthode étant réalisée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez l'homme, notamment à partir de sérum ou de plasma, et comprenant:

- l'incubation de l'échantillon biologique prélevé avec une solution contenant des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement choisies notamment parmi celles citées ci-dessus ou des agents tensio-actifs neutres, notamment ceux cités ci-dessus,
- le dépôt d'une quantité appropriée de l'échantillon biologique ainsi traité sur un gel classique pour électrophorèse,
- une étape de migration électrophorétique,
- la détection de la Lp(a) éventuellement présente dans l'échantillon biologique, notamment à l'aide d'un colorant spécifique des lipoprotéines tel que le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides, ou d'anticorps dirigés contre les lipoprotéines, et en particulier contre la Lp(a).

La position de la Lp(a), qui peut être repérée par un anticorps spécifique anti-Lp(a), est, en pratique courante mettant en oeuvre le procédé de l'invention, révélée par un colorant spécifique des lipoprotéines tel que le Noir Soudan, le Rouge Soudan ou des réactifs enzymatiques spécifiques des lipides.

Ces méthodes de détermination du risque athérogène comprennent avantageusement une étape supplémentaire de dosage de la Lp(a), notamment selon la méthode de LAURELL et al publiée dans Anal. Biochem. (1966) 15:45-52. Le seuil de sensibilité de la méthode de diagnostic de l'invention est de l'ordre de 0,15 g/l de Lp(a) plasmatique, le taux pathologique de Lp(a) étant de l'ordre de 0,3 g/l.

Le procédé selon l'invention permet de façon intéressante, la séparation de la Lp(a) sous sa forme native, des différentes lipoprotéines présentes sous leur forme native dans le milieu biologique déposé sur le gel, et ce par une électrophorèse suivie d'une révélation colorée, sans faire nécessairement appel à la technique d'immunoblot.

Lors de la réalisation du procédé selon l'invention, la Lp(a) est située entre les fractions VLDL et HDL, se trouve ainsi dans une zone parfaitement résolue sur le gel et dépourvue de trainées (donc dépourvue de bruit de fond).

De plus selon le procédé de l'invention, la fraction IDL parfois présente dans la l'hyperlipidémie de type III est située entre la fraction LDL et VLDL et ne peut en aucun cas être confondue avec la Lp(a).

Enfin dans le cas d'échantillons de sérum vieilliss, le ralentissement de la fraction VLDL (pré β) ne peut en aucun cas masquer la Lp(a) qui précède la fraction VLDL.

Par la technique d'électrophorèse sur gel classique et comme conséquence des différents inconvénients décrits plus haut il est mentionné que la lecture densitométrique du lipidogramme présente une moindre spécificité et sensibilité que l'examen visuel de l'analyse.

La corrélation entre les valeurs de Lp(a) obtenues par densitométrie sur gel classique avec une technique de dosage de la Lp(a) par immunonéphélométrie est seulement de $r = 0,55$ (Clinica Chimica Acta, 188 - 1990-p71-78).

Selon le procédé que nous proposons, la corrélation entre la densitométrie du lipidogramme et une tech-

nique de dosage de la Lp(a) par électroimmunodiffusion selon Laurell montre un coefficient de corrélation $\pi = 0,91$ (sur 30 sérums Lp(a) positifs).

L'invention a également pour objet des kits pour la mise en oeuvre d'un procédé ou d'une méthode de diagnostic selon l'invention, comprenant:

- 5 - un gel pour électrophorèse, notamment un gel d'agarose,
- une, ou plusieurs, solution(s) de composés, ces composés étant notamment des cations ou complexes cationiques choisis notamment parmi ceux cités ci-dessus, ou des molécules hydrophobes chargées négativement choisies notamment parmi celles citées ci-dessus ou des agents tensio-actifs neutres choisis notamment parmi ceux cités ci-dessus,
- 10 - la ou les solutions de tampons nécessaires à la migration électrophorétique des lipoprotéines sur le gel,
- les réactifs permettant de détecter les lipoprotéines, dont la Lp(a), après migration sur le gel, notamment le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides.

La solution utilisée dans le kit

- soit sert à retamponner le gel,
- 15 - soit est ajoutée dans l'échantillon biologique.

L'invention concerne également des kits tels que décrits ci-dessus comprenant :

- un gel selon l'invention comprenant au moins un composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines, notamment un gel tel que défini ci-dessus,
- 20 - la ou les solutions de tampons nécessaires à la migration électrophorétique des lipoprotéines sur le gel,
- les réactifs permettant de détecter les lipoprotéines, dont la Lp(a), après migration sur le gel, notamment le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides.

Légende des figures :

- 25 - Figures 1A et 1B :

Les figures 1A et 1B représentent un lipidogramme obtenu sur un gel témoin (ne contenant pas de composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines) d'agarose 0,5 %, le tampon de migration utilisé étant le suivant :

- Tris 0,06 M, Véronal 0,01 M, Véronal sodé 0,05 M, BSA 1 g/l.

Sur les 2 pistes de gauche (pistes 1 et 2), les sérums déposés possèdent un taux de Lp(a) pathologique. Sur les 2 pistes de droite (pistes 3 et 4), les sérums déposés ont un taux de Lp(a) nul ou très faible.

La Figure 1A représente la révélation des lipoprotéines avec du Noir Soudan.

- 35 La Figure 1B représente l'immunofixation avec un antisérum spécifique dirigé contre l'Apo(a) et permet de mettre en évidence la Lp(a) sur les pistes 1 et 2 qui n'était pas visible sur le lipidogramme de la Figure 1A, car la Lp(a) est superposée à la fraction VLDL.

- Figures 2A et 2B :

40 Les figures 2A et 2B représentent un lipidogramme obtenu sur un gel de l'invention contenant 0,03 M d'acétate de magnésium (le tampon est identique à celui décrit dans la Figure 1A). Sur ces gels sont disposés les mêmes sérums que sur les Figures 1A et 1B et aux mêmes positions.

La Figure 2A représente la révélation des lipoprotéines avec du Noir Soudan.

- 45 Sur les deux pistes 1 et 2 de la Figure 2A, on observe la présence d'une bande qui ne figurait pas sur la Figure 1A et qui correspond à la Lp(a).

La Figure 2B représente l'immunofixation avec un antisérum spécifique dirigé contre l'Apo(a) et confirme la révélation de la Lp(a), qui apparaît également dans la Figure 2A.

- 50 - Figure 3 :

La Figure 3 représente un lipidogramme obtenu avec un gel identique à celui des figures 2A et 2B, dans des conditions de migration identiques à celles utilisées dans le cadre des figures 2A et 2B.

Un sérum possédant un taux pathologique en Lp(a), a été déposé sur les 6 pistes.

- 55 Sur les pistes 1 à 5, on a effectué des immunofixations, avec les antisérums suivants:

piste 1 : anti-apoE
piste 2 : anti-apoCIII
piste 3 : anti-apo AI

piste 4 : anti-apo(a)

piste 5 : anti-apoB

piste 6 : on a effectué la coloration des lipoprotéines au Noir Soudan.

On constate que la Lp(a) (constituée d'apo(a) et d'apoB) est séparée des VLDL et LDL, et n'est pas dégradée.

- Figure 4 :

La Figure 4 représente un gel contenant de l'acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2 à 0,026 M. Huit sérums différents contenant des taux allant de 0 à 0,7 g/l de Lp(a) ont été déposés.

La migration a lieu à 50 V pendant 45 mn. La révélation des lipoprotéines est effectuée à l'aide de Noir Soudan.

On constate la présence de la Lp(a) située en arrière de la fraction LDL, et de façon bien différenciée.

- Figures 5A et 5B :

Les Figures 5A et 5B représentent un gel tel que défini pour la Figure 1A, sur lequel on a déposé les quatre échantillons suivants :

- . piste 1 : sérum non traité,
- . piste 2 : sérum traité au Triton X-100 10^{-3} M,
- . piste 3 : sérum traité au Tween 20 10^{-3} M,
- . piste 4 : sérum traité au BRIJ 35 10^{-3} M.

L'électrophorèse a été effectuée dans les conditions décrites à propos de la Figure 1A.

Sur la Figure 5A, les lipoprotéines ont été colorées au Noir Soudan. Sur la Figure 5B, on a effectué une immunofixation avec un antisérum spécifique dirigé contre la Lp(a).

On constate que les détergents neutres ont un effet de freinage sur les lipoprotéines, la Lp(a) étant beaucoup moins affectée que les autres fractions lipoprotéiques.

- Figure 6 :

La Figure 6 représente l'électrophorèse d'un sérum contenant de la Lp(a), sur un gel dans lequel la partie droite comprend une molécule ayant une partie hydrophobe et chargée négativement (acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2) et dans lequel la partie gauche ne comprend pas ce composé et correspond donc à une partie de gel témoin.

Cette expérience montre directement l'effet de l'acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2 sur les différentes fractions lipoprotéiques : les HDL, VLDL et LDL sont fortement accélérées, alors que la Lp(a) garde sensiblement la même mobilité.

EXEMPLE I : DESCRIPTION DES MANIPULATIONS CORRESPONDANT AUX FIGURES 1 ET 2

1) Préparation des gels des figures 1A et 1B :

La composition du gel est la suivante :

- agarose 0,5 %, Tris 0,06 M, Véronal 0,01 M, Véronal sodé 0,05 M, albumine bovine 0,1%.

Dans un Erlenmeyer de 100 ml, on introduit 39 ml d'eau déminéralisée et on ajoute sous agitation magnétique 0,25 g d'agarose. On porte à ébullition pendant 5 mn sur plaque chauffante et sous agitation constante. L'agarose est alors dissout, donnant une solution parfaitement limpide. On équilibre ensuite la température de la solution à 50°C dans un bain thermostaté.

Dans un Erlenmeyer de 50 ml, on introduit 10 ml d'eau déminéralisée et on ajoute sous agitation magnétique 0,36 g de Tris, 0,092 g de Véronal, 0,515 g de Véronal sodé. Après dissolution complète, l'ensemble est stabilisé à 50°C dans le bain thermostaté.

Dans un tube à hémolyse, on introduit 1 ml d'eau déminéralisée et 0,05 g d'albumine bovine. La dissolution est accélérée à l'aide d'un vortex. La solution est portée à 50°C.

Dans l'Erlenmeyer de 100 ml contenant la solution d'agarose, on ajoute sous agitation magnétique les solutions concentrées de tampon et d'albumine bovine. L'ensemble est bien homogénéisé et maintenu à 50°C.

Le gel est ensuite coulé. Pour ce faire, 5 ml de cette solution sont répartis uniformément sur un film plastique hydrophile de dimensions 10 x 8 cm.

2) Préparation des gels des figures 2A ET 2B :

La composition du gel est la suivante :

- agarose 0,5%, Tris 0,06 M, Véronal 0,01 M, Véronal sodé 0,05 M, acétate de magnésium 0,03 M, albumine bovine 0,1%.

La préparation du gel suit le même protocole que celui des figures 1A et 1B, à la différence près que l'on ajoute 0,322 g d'acétate de magnésium tétrahydraté à la solution tampon concentré.

3) Conditions de migration :

Les sérums frais sont déposés à 2, 5 cm du bord cathodique du gel (dépôts de 3 μ l).

La migration est réalisée en tampon Tris 0,06 M, Véronal 0,01 M, Véronal sodé 0,05 M à 50 V pendant 45 mn.

Dans le cas des figures 1A et 1B, la migration dure pendant 45 mn.

Dans le cas des figures 2A et 2B, la migration est poursuivie pendant 1 h.

Après la migration, le gel est séché complètement et coloré avec un colorant des lipides (Noir Soudan) (figures 1A et 2A), ou soumis à une immunofixation avec un antisérum spécifique dirigé contre la Lp(a) (figures 1B et 2B).

EXEMPLE II : DESCRIPTION DES MANIPULATIONS CORRESPONDANT A LA FIGURE 6 :

Le gel est identique à celui de la Figure 4. Une prémigration d'une heure à 50 V est effectuée dans le sens indiqué sur la Figure. Au cours de cette prémigration, l'anion se déplace vers l'anode, de sorte que la partie cathodique du gel s'en trouve dépourvue.

Un dépôt unique d'un sérum contenant de la Lp(a) est ensuite pratiqué sur toute la longueur du gel, et la migration s'effectue dans le sens perpendiculaire à celui de la prémigration pendant 45 mn. Les lipoprotéines sont ensuite colorées au Noir Soudan.

EXEMPLE III : COMPARAISON DES DISTANCES DE MIGRATION DES FRACTIONS LIPOPROTEIQUES SUR DIFFERENTS GELS :

d distance de migration sur le gel contenant le composé

d_r distance de migration sur le gel témoin

1) Gel de l'invention avec acétate de magnésium 0,03 M (gel de la Figure 2):

Fraction lipoprotéique	HDL	VLDL	LDL	Lp(a)
$\frac{d}{d_r}$	0,75	0,61	0,5	0,96

2) Gel de l'invention contenant l'acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2 0,026 M (gel de la Figure 4):

Fraction lipoprotéique	HDL	VLDL	LDL	Lp(a)
$\frac{d}{d_r}$	1,42	1,9	2,67	1,1

EXEMPLE IV

Un gel classique de même composition que celui obtenu dans l'exemple I correspondant aux figures 1A et 1B est soumis avant le dépôt des échantillons à une préélectrophorèse avec le tampon Tris 0,06M, Veronal acide 0,01 M Veronal sodé 0,05 M, albumine bovine 0,1% auquel a été ajouté dans le bac cathodique, l'acide

hydroxy 1 naphthalénicarboxylique 2 à la concentration de 0,026M.

Après 30' de migration sous 50 Volts correspondant à un gradient de potentiel d'environ 6 V/cm, la pénétration dans le gel de l'acide hydroxy 1 naphthalène carboxylique 2 est de 40 mm à partir du bac cathodique. Les échantillons sont alors déposés dans cette zone par exemple à 30 mm du bord cathodique du gel et la migration des échantillons est alors réalisée avec les mêmes tampons pendant 45' sous une tension de 50 V.

Les lipidogrammes obtenus sont identiques à ceux obtenus sur le gel de la figure 4.

EXEMPLE V

Un gel classique de même composition que celui de l'exemple I figures 1A et 1B est soumis avant le dépôt des échantillons à une préélectrophorèse avec le tampon de migration Tris 0,6M, Veronal acide 0,01M, veronal sodé 0,05 M, albumine bovine 0,1% auquel a été ajouté dans le bac anodique $5 \cdot 10^{-2}$ M d'acétate de magnésium.

Après 45' de migration sous 50 V correspondant à un gradient de potentiel d'environ 6V/cm la pénétration dans le gel des ions Mg^{2+} à partir du bac anodique est de 40 mm.

Les échantillons sont alors déposés dans une zone du gel qui n'a pas encore été atteinte par le front des ions Mg^{2+} venant du bac anodique et située par exemple à 45 mm du bord anodique du gel. La migration est alors réalisée avec les mêmes tampons pendant 1 h sous une tension de 50 V. Le profil obtenu est analogue à celui obtenu sur les gels des figures 2A et 2B avec en particulier la fraction Ipa précédant la fraction VLDL mais avec une meilleure séparation entre la fraction LDL et le point de dépôt des échantillons.

Revendications

1. Procédé de séparation par électrophorèse de la Lp(a) et des différentes lipoprotéines contenues dans un milieu biologique, caractérisé en ce que la migration électrophorétique des lipoprotéines est réalisée dans des conditions telles que le gel d'électrophorèse et/ou le milieu biologique sus-mentionné contient des composés susceptibles de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a), par rapport à celle des autres lipoprotéines.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit composé permet de séparer, dans un milieu biologique, la fraction Lp(a) des fractions VLDL et LDL, de préférence tout en conservant la séparation des HDL, LDL et VLDL.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport à celle des autres lipoprotéines est choisi parmi les cations ou complexes cationiques, les molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement ou les agents tensio-actifs neutres.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport à celle des autres lipoprotéines est choisi parmi les cations ou complexes cationiques dont les hydroxydes, à pH allant d'environ 8 à environ 9, ne sont pas précipités ou sont partiellement précipités, de telle sorte qu'il y ait au moins 10^{-3} moles/l de cations ou de complexes cationiques non précipités dans le gel pour électrophorèse.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cations ont un degré d'oxydation supérieur ou égal à 2, et sont de préférence choisis parmi les colonnes IIa, IIIa et IIIb du tableau de Mandeleiev, et sont notamment choisis parmi Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , In^{3+} et Y^{3+} , de préférence Mg^{2+} , et en ce que les complexes cationiques sont notamment choisis parmi NH_4^+ , $(NH_4)_2Fe^{2+}$, $NH_4^+Fe^{3+}$.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration des cations ou complexes cationiques, dans le gel d'électrophorèse, est de l'ordre de 10^{-3} M à 10^{-1} M, de préférence de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$ M à $3 \cdot 10^{-2}$ M.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines est une molécule ayant une partie hydrophobe et chargée négativement.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la molécule ayant une partie hydrophobe et char-

gée négativement.

soit fait partie de la classe des agents tensio-actifs anioniques et comprend

* soit une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée de 3 à 10 atomes de carbone, comportant éventuellement des hétéroatomes, comportant une fonction acide telle que sulfurique, sulfonique, carboxylique ou phosphorique, et possédant une chaîne aliphatique condensée comportant au moins 1 à 6 cycles saturés de 5 ou 6 atomes de carbone,

* soit une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée d'au moins 8 atomes de carbone, de préférence de 10 à 18 atomes de carbone, cette chaîne étant le cas échéant substituée par un (ou plusieurs) cycle(s) ou hétérocycle(s) aromatique(s), ladite chaîne ou ce (ou ces) cycle(s) ou hétérocycle(s) aromatique(s) étant substitué(s) par une fonction acide telle que carboxylique, sulfonique, sulfurique ou phosphorique,

soit est un dérivé aromatique chargé négativement et comportant au moins deux cycles aromatiques condensés tel que le naphthalène, ou un cycle aromatique condensé à un hétérocycle aromatique telle que la quinoléine, ou deux hétérocycles aromatiques condensés, l'un au moins des cycles comportant une fonction acide telle que carboxylique, sulfonique, sulfurique ou phosphorique et l'autre cycle ne comportant pas de fonction susceptible de faire perdre à l'ensemble de la molécule son caractère hydrophobe et notamment ne comportant pas de charge polaire,

cette molécule ayant une partie hydrophobe et chargée négativement étant notamment choisie parmi les composés suivants:

- sodium dodécylsulfate,
- sodium dodécylbenzènesulfonate,
- cholate de sodium,
- acide naphthalène carboxylique-2,
- acide naphthalène sulfonique-2,
- acide amino-2 naphthalène sulfonique-1,
- acide hydroxy-4 naphthalène sulfonique-1,
- acide amino-1 naphthalène sulfonique-5,
- Noir Amido,
- Violet Acide 17,
- Bleu de Coomassie R250,
- Palatine fast black wan,

et de préférence

- acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2,
- acide hydroxy-3 naphthalène carboxylique-2.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines est un agent tensio-actif neutre (ou détergent neutre).

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel l'agent tensio-actif neutre est tel qu'il est soluble en phase aqueuse et est avantageusement choisi parmi le Triton X100®, Triton X405®, le Tween 20®, le NP40® et le BRIJ35®.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la concentration des agents tensio-actifs anioniques ou des agents tensio-actifs neutres dans le gel d'électrophorèse, est de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-3} M, de préférence de 10^{-4} à 10^{-3} M, et s'ils sont introduits préalablement dans le milieu biologique de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-1} M et de préférence de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-2} M.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la concentration des dérivés aromatiques chargés négativement dans le gel est d'environ 10^{-3} à 10^{-1} M, de préférence d'environ 10^{-2} à $5 \cdot 10^{-2}$ M, et s'ils sont introduits préalablement dans le milieu biologique, d'environ 10^{-2} M à environ 1 M, de préférence d'environ $5 \cdot 10^{-2}$ M à environ $5 \cdot 10^{-1}$ M.

13. Gel pour électrophorèse caractérisé en ce qu'il comprend des cations ou complexes cationiques, notamment choisis parmi Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , In^{3+} , Y^{3+} , de préférence Mg^{2+} , et en ce que les complexes cationiques sont choisis parmi NH_4^+ , $(NH_4)_2Fe^{2+}$, $NH_4^+Fe^{3+}$ en mélange avec des agents tensio-actifs neutres, notamment choisis parmi:

- Triton X100.

- Triton X405,
- Tween 20,
- NP40 et
- BRIJ35.

5

14. Gel pour électrophorèse caractérisé en ce qu'il comprend des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement, notamment choisies parmi:

10

- sodium dodécylsulfate,
- sodium dodécylbenzènesulfonate,
- cholate de sodium,
- acide naphthalène carboxylique-2,
- acide naphthalène sulfonique-2,
- acide amino-2 naphthalène sulfonique-1,
- acide hydroxy-4 naphthalène sulfonique-1,
- acide amino-1 naphthalène sulfonique-5,
- Noir Amido,
- Violet Acide 17,
- Bleu de Coomassie R250,
- Palatine fast black wan,

15

20

et de préférence

- acide hydroxy-1 naphthalène carboxylique-2,
- acide hydroxy-3 naphthalène carboxylique-2.

25

15. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, à la détermination, chez l'Homme, du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a) dans l'organisme.

16. Méthode de détermination *in vitro* du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a), cette méthode étant réalisée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez l'homme, notamment à partir de sérum ou de plasma, et comprenant:

30

35

40

45

- le dépôt d'une quantité appropriée de l'échantillon biologique sous forme liquide sur un gel d'électrophorèse contenant au moins un composé susceptible de modifier de façon différentielle la mobilité électrophorétique de la Lp(a) par rapport aux autres lipoprotéines tel que défini dans l'une des revendications 1 à 12, notamment un gel selon l'une des revendications 13 à 15, ou sur un gel préparé extemporanément, à partir d'un gel classique ne comprenant pas de composé tel que défini ci-dessus, par immersion, pendant un temps suffisant, de ce gel classique dans une solution du susdit composé pour que pénétre la quantité requise de composé sus-mentionné, notamment d'une solution contenant des cations ou complexes cationiques choisis notamment parmi ceux cités dans la revendication 5, ou des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement choisies notamment parmi celles citées dans la revendication 8 ou des agents tensio-actifs neutres choisis notamment parmi ceux cités dans la revendication 10,
- une étape de migration électrophorétique,
- la détection de la Lp(a) éventuellement présente dans l'échantillon biologique, notamment à l'aide d'un colorant spécifique des lipoprotéines tel que le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides, ou d'anticorps marqués dirigés contre les lipoprotéines, et en particulier contre la Lp(a).

50

55

17. Méthode de détermination *in vitro* du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a), cette méthode étant réalisée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez l'homme, notamment à partir de sérum ou de plasma, et comprenant:

- l'incubation de l'échantillon biologique prélevé avec une solution contenant des molécules ayant une partie hydrophobe et chargées négativement choisies notamment parmi celles citées dans la revendication 8 ou des agents tensio-actifs neutres, notamment ceux cités dans la revendication 10,
- le dépôt d'une quantité appropriée de l'échantillon biologique ainsi traité sur un gel classique pour électrophorèse,
- une étape de migration électrophorétique,
- la détection de la Lp(a) éventuellement présente dans l'échantillon biologique, notamment à l'aide d'un colorant spécifique des lipoprotéines tel que le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan, ou de réactifs enzymatiques spécifiques des lipides, ou d'anticorps dirigés contre les lipoprotéines, et en par-

ticulier contre la Lp(a).

18. Méthode de détermination du risque athérogène lié à la présence de la Lp(a) selon la revendication 17 ou la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape supplémentaire de dosage de la Lp(a), notamment selon la méthode de LAURELL et al.

19. Kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 12, ou d'une méthode selon l'une des revendications 17 à 19, comprenant:

- un gel pour électrophorèse, notamment gel d'agarose,
- une, ou plusieurs, solution(s) de composés, ces composés étant notamment des cations ou complexes cationiques choisis notamment parmi ceux cités dans la revendication 5, ou des molécules hydrophobes chargées négativement choisies notamment parmi celles citées dans la revendication 8 ou des agents tensio-actifs neutres choisis notamment parmi ceux cités dans la revendication 10, la solution étant utilisée
 - . soit pour retamponner le gel,
 - . soit pour être ajoutée dans l'échantillon biologique,
- la ou les solutions de tampons nécessaires à la migration électrophorétique des lipoprotéines sur le gel,
- les réactifs permettant de détecter les lipoprotéines, dont la Lp(a), après migration sur le gel, notamment le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan ou des réactifs enzymatiques spécifiques des lipides.

20. Kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 12, ou d'une méthode selon l'une des revendications 17 à 19, comprenant:

- un gel selon l'une des revendications 13 à 15,
- la ou les solutions de tampons nécessaires à la migration électrophorétique des lipoprotéines sur le gel,
- les réactifs permettant de détecter les lipoprotéines, dont la Lp(a), après migration sur le gel, notamment le colorant Noir Soudan, Rouge Soudan ou des réactifs enzymatiques spécifiques des lipides.

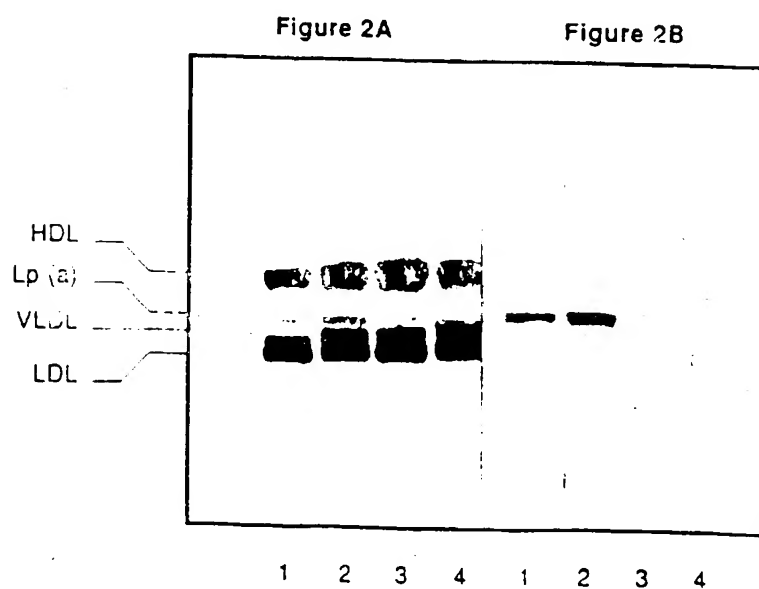
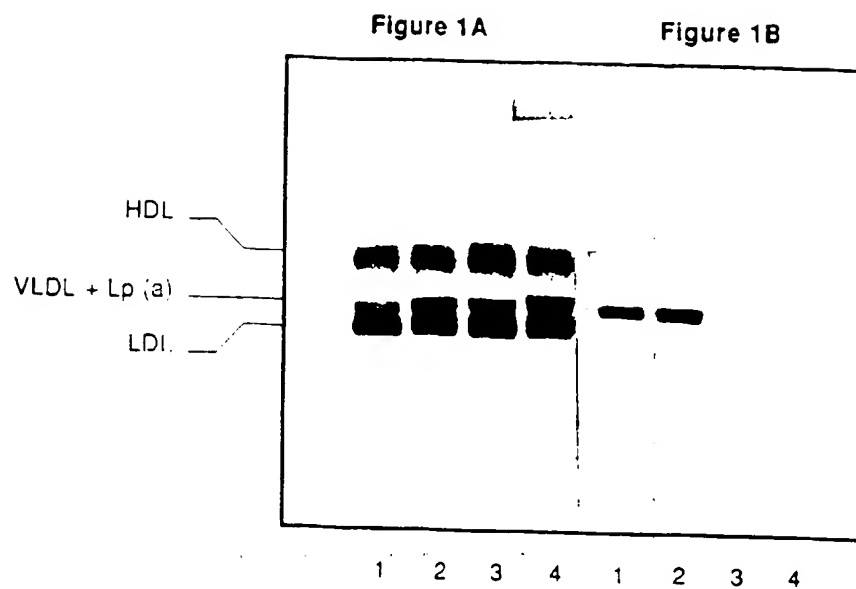


Figure 3



Figure 4

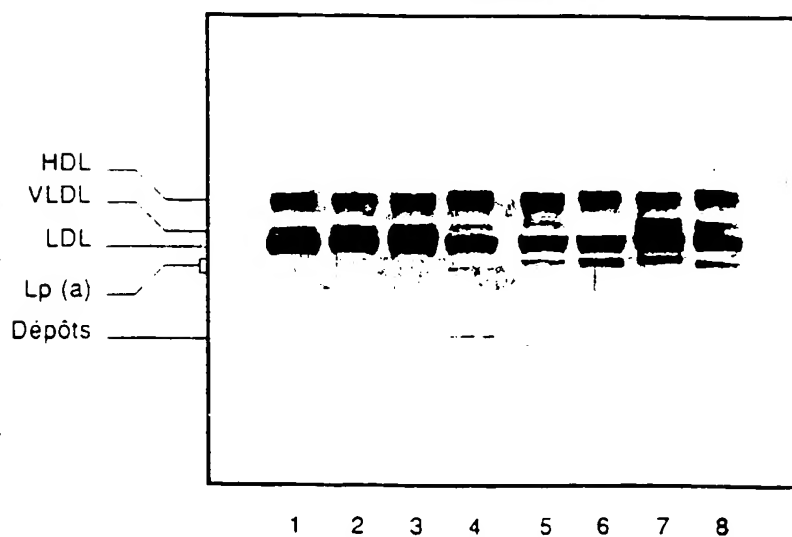


Figure 5A

Figure 5B

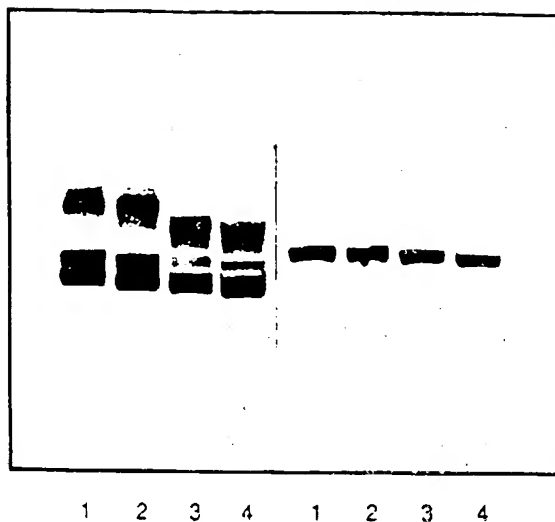
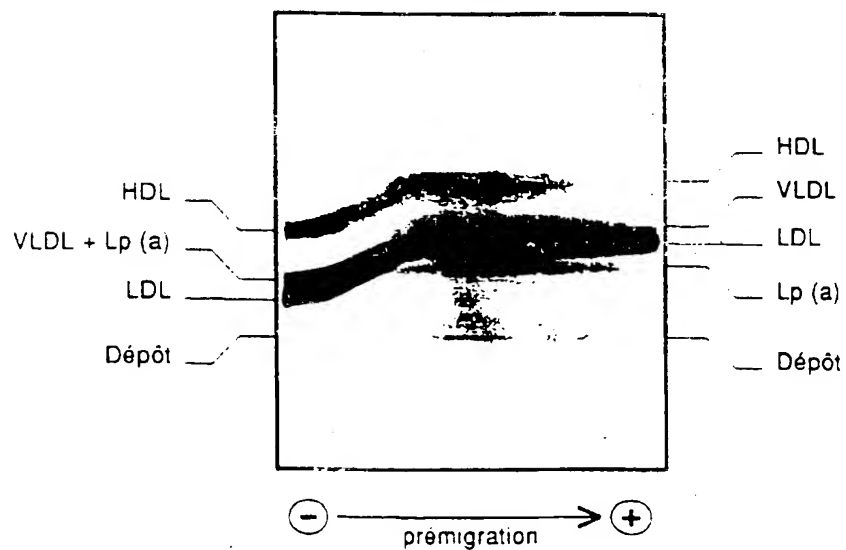


Figure 6





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 40 3309

Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
X	AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS vol. 49, no. 5, Novembre 1991, CHICAGO, USA pages 1063 - 1074 KAMBOH M.I. ET AL. 'Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein(a)' * page 1064, colonne de droite, ligne 22 - page 1066, colonne de gauche, ligne 19 *	1-3,7,8, 14	G01N33/92 G01N27/26
A	WO-A-8 202 599 (BECKMAN INSTRUMENTS) * page 2, ligne 18 - page 3, ligne 22; revendication 31 *	13	
A	WO-A-8 900 689 (BECKMAN INSTRUMENTS) * page 10, ligne 4 - ligne 19 * * page 12, ligne 17 - ligne 24; revendication 8; exemples *	13	
A	ELECTROPHORESIS vol. 7, no. 5, Mai 1986, WEINHEIM, GERMANY pages 197 - 203 BOERSUM T. ET AL. 'Electrophoretic migration velocity of amphiphilic proteins increases with decreasing Triton X-100 concentration: A new characteristic for their identification' * le document en entier *	1,3,9, 10,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) G01N
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 257, no. 1, 10 Janvier 1982, BALTIMORE US pages 501 - 507 G.UTERMANN ET AL. 'Genetic variants of group A apolipoproteins' * abrégé, figure 1 *	1,3,9,10	
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 257, no. 1, 10 Janvier 1982, BALTIMORE US pages 501 - 507 G.UTERMANN ET AL. 'Genetic variants of group A apolipoproteins' * abrégé, figure 1 *	13,14	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 04 MARS 1993	Examineur LUZZATTO E.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : thèse ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : arriére-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arriére-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 03.82 (P0402)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 40 3309
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	<p>CLINICA CHIMICA ACTA vol. 188, no. 1, 1990, AMSTERDAM, NL pages 71 - 77 BRUCKERT E. ET AL. 'Does electrophoresis reliably screen for high serum lipoprotein(a)?' * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1	
			<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)</p>
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 04 MARS 1993	Examineur LUZZATTO E.R.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>I : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1501 (01/87) (P0401)